

## 2. Bcl-xL

Andersenらのグループは抗アポトーシス分子の一つであるBcl-XLもまたCTLの標的となりうることを証明している<sup>38)</sup>。

## 3. Mcl-1

やはりAndersenらのグループが抗アポトーシス活性をもつMcl-1由来のHLA-A1拘束性抗原ペプチドの同定に成功している<sup>39)</sup>。Mcl-1はまた、血液系幹細胞に発現し、血液幹細胞がアポトーシス死による枯渇から守っていることが示されている<sup>40)</sup>。これらのことから、Mcl-1は血液系腫瘍の幹細胞を標的とした免疫療法をデザインできる可能性がある。

## 4. BAX-delta

BAXはプロアポトティックタンパクの一つで、Bcl-2と結合することにより、細胞のアポトーシスを促進する分子である。BAXにはいくつかスプライシングバリエントが知られているが、エクソン3を欠失することによりデスドメインを欠くバリエントとしてBAX-deltaが知られている。その詳細な機能は不明であるが、デスドメインを有する野生型BAXと結合することにより、BAXのアポトーシス誘導能を抑制することにより、アポトーシス抑制能を有する可能性が示唆されている。

Maiaらのグループはマイクロアレイを用いたスクリーニングで、B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) に高発現する遺伝子の一つとしてBAX-deltaを同定している<sup>41)</sup>。BAX-deltaのエクソン2とエクソン4結合部位にコードされるHLA-A2拘束性抗原ペプチドの同定に成功している。BAX-deltaはエクソン3を欠くため、エクソン2、エクソン4結合部位のアミノ酸配列はBAX-delta特異的であると考えられる。野生型BAXがプロアポトティック機能を有し、正常組

織で発現がみられるのに対し、BAX-deltaは腫瘍特異的な発現様式を示し、免疫原性を獲得したと考えられる。

## 5. ML-IAP/Livin

ML-IAP/Livinは悪性黒色腫に高発現するIAPファミリー遺伝子melanoma-IAP (ML-IAP) として同定されたアポトーシス抑制分子である。ML-IAP/Livinは悪性黒色腫で、非常に免疫原性の高い抗原分子として同定されている<sup>42)</sup>。また最近、ML-IAP/Livinは悪性黒色腫のみならず、様々な悪性腫瘍で高発現することが知られており、悪性黒色腫以外の悪性腫瘍でも免疫療法の標的分子となりうることも示されている。我々は、肺がん組織にてML-IAP/Livinが高発現することを見出した<sup>43)</sup>。また、ML-IAP/Livinは非常に免疫原性の高い分子であり、高頻度に肺がん患者にて細胞性、液性免疫を確認することができる<sup>44)</sup>。また、上記MariaらのグループはB-ALLにおいてもML-IAP/Livinが高発現することも見出している。これらのことから、ML-IAP/Livinは様々な悪性腫瘍に発現し、しかも、免疫原性が強く、免疫療法の標的分子として理想的な分子の一つといえる。

## 6. サバイビン

サバイビンは、上記の通り抗アポトーシス能をもつ分子で、悪性腫瘍に対する化学療法や、放射線療法に対する耐性獲得の原因遺伝子の一つと考えられている<sup>45)</sup>。化学療法や、放射線療法が効果を奏さない症例でも免疫療法の標的として期待できる分子である。

## 7. HSP105

Nakatsuraらのグループは膵がん患者の血清を用いて、液性免疫が認識する抗原分子としてHSP105を同定している<sup>46)</sup>。後に同グループは、

HSP105のDNAワクチンを用いて, HSP105がCD4およびCD8 T細胞依存性に, 抗腫瘍効果を有する腫瘍抗原であることを証明している<sup>47)</sup>. 興味深いことに, HSP105をsiRNAでノックダウンすると, 様々ながん種細胞株でアポトーシスを誘導し, HSP105はアポトーシス耐性を有する分子であることが示唆されるが, その詳細はいまだ不明であり, 今後の解析が期待される<sup>48)</sup>.

## F. 無限増殖能にかかわる遺伝子

正常細胞は, 分裂するたびにテロメアが短くなり, テロメアが一定の長さまで短くなると染色体不安定性を引き起こすことにより, 細胞が分裂できなくなる. しかしながらがん細胞においては, テロメアを伸張する機構が働いており, テロメア長を保っている. テロメラーゼは正常組織においては, 胸腺, 精巣, 骨髄などの限られた臓器にのみ発現するが, がん組織においては, 高頻度に高発現することが明らかになっている<sup>49)</sup>.

### テロメラーゼ

Vonderheideらのグループは, テロメラーゼ由来のHLA-A2拘束性抗原ペプチドにより, 様々ながん腫を認識することができるCTLを誘導することができることを証明している<sup>50)</sup>. ほぼ全てのがん細胞はテロメラーゼを高発現することが明らかになっており, 魅力的な標的分子と考えられる. しかしながら, テロメラーゼは上記の通り正常組織にも発現する遺伝子であり, 免疫寛容が引き起こされている可能性がある. Grossらのグループは, HLA分子に高~低結合力を示すテロメラーゼ由来のHLA-A2拘束性ペプチドを複数デザインしてCTL誘導実験を行った結果, HLA-A2分子に高結合力で結合する抗原ペプチドを認識するCTLは免疫寛容に陥っており, 逆に, 低結合力を示す抗原ペプチドの方において免疫原

性が高かったことを示している<sup>51)</sup>. テロメラーゼは胸腺にも発現する分子であり, 高結合力でHLA-A2分子に結合する抗原ペプチドを認識するCTLは胸腺で除去されていた可能性を示唆するものである. このような免疫寛容の問題を乗り越えることができるならば, 非常に魅力的な標的分子の一つである.

## G. 幹細胞性にかかわる遺伝子群

がん幹細胞を同定するマーカーとなる遺伝子群はいくつか知られている<sup>5)</sup>. しかしながら現時点において絶対的なものはいまだ報告されていない. 現在がん幹細胞を分離する一つの方法として, セルソーターを用いてside population (SP) として分離する方法が知られている<sup>52)</sup>. これは, がん幹細胞は膜トランスポーター分子を高発現しており, ヘキスト33342という色素を細胞外に汲み出す能力が高く, 染色され難いことを利用するものである. 我々は, SPを用いて肺がん幹細胞の候補抗原分子としてSOXファミリー遺伝子群を同定したが, SOXファミリー遺伝子群は中枢神経系腫瘍や, 悪性黒色腫などでは免疫原性も確認されており, がん幹細胞標的分子となりうる可能性を示唆するものである.

### 1. SOX2

SOX遺伝子ファミリーはHMBドメインをもつDNA結合分子である. その中でもSOX1, SOX2, SOX3は神経幹細胞の有する自己複製能に必須な遺伝子として知られている<sup>53)</sup>. また, Takahashiらのグループは線維芽細胞にc-Myc, Oct-3/4, SOX2, Klf4というたった4つの遺伝子を導入することにより人工的ES細胞の作製に成功している<sup>54)</sup>. このことは, SOX2遺伝子が, 幹細胞性の形質発現に重要な役割を果たしていることを示唆する.

一方で、これらのSOXファミリー遺伝子群はSEREX法により、小細胞肺癌症例で、抗体により認識される腫瘍抗原分子としても同定されている<sup>55)</sup>。小細胞肺癌は神経内分泌系の性格をもった悪性腫瘍であり、神経幹細胞に発現するSOX遺伝子ファミリーが、神経系への分化にかかわっている可能性が示唆される。また、SOX2にコードされるHLA-A2拘束性抗原ペプチドも同定されており、神経系悪性腫瘍もしくは、神経内分泌系の性格をもつ悪性腫瘍の標的となりえると考えられる<sup>56)</sup>。さらに、SOX2は良性単クローン性 $\gamma$ グロブリン血症の患者において、抗SOX2の液性および、細胞性免疫が確認されている<sup>57)</sup>。このことはSOX2タンパクが非常に免疫原性を示すことが示唆される。これらのことから、中枢神経系悪性腫瘍や、肺がんのがん幹細胞を標的とした免疫療法を考える場合、SOX2はその標的となりえると考えられる。

## 2. SOX10

SOX10は神経性難聴、色素沈着低下、神経節細胞欠損性巨大結腸症の症状を示すタイプ4のWaardenburg症候群の原因遺伝子として知られている。Khongらのグループは、免疫療法に著効を示した悪性黒色腫患者のHLA-A2拘束性腫瘍浸潤リンパ球を用いて、その認識する抗原分子としてSOX10を同定している<sup>58)</sup>。SOX10はまた、TRP2や悪性黒色腫発生のマスター遺伝子と考えられているmicrophthalmia-associated transcription factorの転写、発現を制御しており、悪性黒色腫の発生に重要な役割を果たしていると考えられる。これらのことから、SOX10は悪性黒色腫のがん幹細胞の標的分子となりうる可能性がある。

### むすび

これまで述べてきたとおり、腫瘍抗原分子とし

て同定された遺伝子群のかなりの数の遺伝子が、細胞の腫瘍化にとっても重要な働きをもっている。腫瘍抗原分子は、正常細胞に比べて、がん細胞で高発現する分子群であることを考えると非常に理にかなっている。以上に述べてきた腫瘍抗原分子の機能的側面は、がんの生物学的側面を理解するうえで有用であるばかりでなく、免疫療法と他の治療法を併用する場合に有用になると考えられる。

たとえば、免疫療法と、化学療法もしくは放射線療法の併用を考えると、トポイソメラーゼI拮抗剤や、代謝拮抗剤、放射線療法は、がん細胞をG1期で停止することが知られている。ならば、G1期で停止したがん細胞は、細胞周期にかかわる抗原分子群で、G1/S期に高発現する分子を高発現すると考えられるので、G1/S期抗原分子での免疫療法を併用するとより効果的になると考えられる。G2/M期で細胞を停止させるトポイソメラーゼII拮抗剤や、ピンカアルカロイド製剤、タキサン系製剤と、G2/M期に発現する抗原分子を用いた免疫療法も同様に有効と考えられる。実際、我々は、がん細胞をタキソールやVP-16で処理するとG2/M期抗原分子群(サバイビン、オーロラAキナーゼ、CEP55/c10orf3)の発現が上昇することを確認している。また、逆に負の効果もあり得る。たとえば、サバイビンは、HER-2やEGFRの下流に位置することが知られている<sup>59,60)</sup>。とすると、HER-2やEGFRを標的とした(ハーセプチン、ゲフィニチブ)分子標的治療を行うと、がん細胞のサバイビンの発現が低下し、サバイビンを用いた免疫療法はハーセプチンやゲフィニチブとの併用に向かないと考えられる。このように、腫瘍抗原分子を機能的側面にて理解することは、がん治療の臨床の場に直接利益をもたらすものと考えられる。

化学療法や、放射線療法、あるいは分子標的治療も含めて、既存のがんの治療法は、その副作用

は無視できない。残念ながらこれら苦痛をもたらす治療は、たとえ生物学的に腫瘍の退縮をもたらすことが可能であっても、患者にとってはその苦痛ゆえに、精神的には患者を病気から治癒させているとは考え難い側面もある。抗原分子の機能をとらえつつ合理的な免疫療法をデザインし、これまで進歩を遂げてきた化学療法や、放射線療法といった既存のがん治療法との接点を探ることにより、免疫療法は新たにスタンダードながんの治療法として確立されると考えられる。

#### <追伸>

当教室では上記のように、がん免疫療法を化学療法、放射線療法といった既存の治療法と比肩するようながんの標準的な治療法として確立するための基礎的な研究を進めている。がんの免疫療法に関して御興味をもたれた方がおられたら、是非お気軽に御連絡頂きたい。hirohash@sapmed.ac.jp

#### 文献

- 1) van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991; 254: 1643-7.
- 2) Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*. 1997; 9: 684-93.
- 3) <http://www.cancerimmunity.org/peptide/database/Tcellepitopes.htm>
- 4) Hanahan D, and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- 5) Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1253-61.
- 6) Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, et al. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med*. 1995; 181: 2109-17.
- 7) Okugawa T, Ikuta Y, Takahashi Y, et al. Novel human HER2-derived peptide homologous to the mouse K(d)-restricted tumor rejection antigen can induce HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes in ovarian cancer patients and healthy individuals. *Eur J Immunol*. 2000; 30: 3338-46.
- 8) Ko HJ, Kim YJ, Kim YS, et al. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res*. 2007; 67: 7477-86.
- 9) Shomura H, Shichijo S, Komatsu N, et al. Identification of epidermal growth factor receptor-derived peptides recognised by both cellular and humoral immune responses in HLA-A24+ non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer*. 2004; 40: 1776-86.
- 10) Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, et al. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res*. 2002; 62: 5818-27.
- 11) Schag K, Schmidt SM, Muller MR, et al. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res*. 2004; 10: 3658-66.
- 12) Chiari R, Hames G, Stroobant V, et al. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4 T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res*. 2000; 60: 4855-63.
- 13) Balakrishnan A, Bleeker FE, Lamba S, et al. A novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. *Cancer Res*. 2007; 67: 3545-50.
- 14) Hanada K, Yewdell JW, Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature*. 2004; 427: 252-6.
- 15) Dengjel J, Decker P, Schoor O, et al. Identification of a naturally processed cyclin D1 T-helper epitope by a novel combination of HLA class II targeting and differential mass spectrometry. *Eur J Immunol*. 2004; 34: 3644-51.
- 16) Kao H, Marto JA, Hoffmann TK, et al. Identification of cyclin B1 as a shared human epithelial tumor-associated antigen recognized by T cells. *J Exp Med*. 2001; 194: 1313-23.
- 17) Andersen MH, Pedersen LO, Becker JC, et al. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein

- survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61: 869-72.
- 18) Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, et al. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 1731-9.
  - 19) Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, et al. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res.* 2000; 60: 1815-7.
  - 20) Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 1474-82.
  - 21) Tsuruma T, Hata F, Torigoe T, et al. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med.* 2004; 2: 19.
  - 22) Marumoto T, Zhang D, Saya H. Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 42-50.
  - 23) Katayama H, Sasai K, Kawai H, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet.* 2004; 36: 55-62.
  - 24) Fabbro M, Zhou BB, Takahashi M, et al. Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev Cell.* 2005; 9: 477-88.
  - 25) Sakai M, Shimokawa T, Kobayashi T, et al. Elevated expression of C10orf3 (chromosome 10 open reading frame 3) is involved in the growth of human colon tumor. *Oncogene.* 2006; 25: 480-6.
  - 26) Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase I for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 321-30.
  - 27) Shichijo S, Nakao M, Imai Y, et al. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; 187: 277-88.
  - 28) Kittler R, Putz G, Pelletier L, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature.* 2004; 432: 1036-40.
  - 29) Asai T, Storkus WJ, Mueller-Berghaus J, et al. In vitro generated cytolytic T lymphocytes reactive against head and neck cancer recognize multiple epitopes presented by HLA-A2, including peptides derived from the p53 and MDM-2 proteins. *Cancer Immun.* 2002; 2: 3.
  - 30) Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: Protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; Aug: 24.
  - 31) Godefroy E, Moreau-Aubry A, Diez E, et al. alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J Exp Med.* 2005; 202: 61-72.
  - 32) Ishizaki H, Tsunoda T, Wada S, et al. Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 5841-9.
  - 33) Wada S, Tsunoda T, Baba T, et al. Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res.* 2005; 65: 4939-46.
  - 34) Boss CN, Grunebach F, Brauer K, et al. Identification and characterization of T-cell epitopes deduced from RGS5, a novel broadly expressed tumor antigen. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 3347-55.
  - 35) Furuya M, Nishiyama M, Kimura S, et al. Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. *J Pathol.* 2004; 203: 551-8.
  - 36) O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol.* 2000; 156: 393-8.
  - 37) Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P, et al. Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer. *Blood.* 2005; 105: 728-34.
  - 38) Andersen MH, Reker S, Kvistborg P, et al. Spontaneous immunity against Bcl-xL in cancer patients. *J Immunol.* 2005; 175: 2709-14.
  - 39) Andersen MH, Becker JC, Thor Straten P. The antiapoptotic member of the Bcl-2 family Mcl-1 is a CTL target in cancer patients. *Leukemia.*

- 2005; 19: 484-5.
- 40) Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*. 2005; 307: 1101-4.
- 41) Maia S, Haining WN, Ansen S, et al. Gene expression profiling identifies BAX-delta as a novel tumor antigen in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*. 2005; 65: 10050-8.
- 42) Schmollinger JC, Vonderheide RH, Hoar KM, et al. Melanoma inhibitor of apoptosis protein (ML-IAP) is a target for immune-mediated tumor destruction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 3398-403.
- 43) Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 1000-9.
- 44) Yagihashi A, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Detection of autoantibodies to livin and survivin in Sera from lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2005; 48: 217-21.
- 45) Li F, Ling X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? *J Cell Physiol*. 2006; 208: 476-86.
- 46) Nakatsura T, Senju S, Yamada K, et al. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281: 936-44.
- 47) Miyazaki M, Nakatsura T, Yokomine K, et al. DNA vaccination of HSP105 leads to tumor rejection of colorectal cancer and melanoma in mice through activation of both CD4 T cells and CD8 T cells. *Cancer Sci*. 2005; 96: 695-705.
- 48) Hosaka S, Nakatsura T, Tsukamoto H, et al. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2006; 97: 623-32.
- 49) Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006; 22: 531-57.
- 50) Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, et al. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*. 1999; 10: 673-9.
- 51) Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, et al. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest*. 2004; 113: 425-33.
- 52) Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 781-6.
- 53) Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, et al. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci*. 2003; 6: 1162-8.
- 54) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663-76.
- 55) Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ, et al. Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 4198-203.
- 56) Schmitz M, Temme A, Senner V, et al. Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy. *Br J Cancer*. 2007; 96: 1293-301.
- 57) Spisek R, Kukreja A, Chen LC, et al. Frequent and specific immunity to the embryonal stem cell-associated antigen SOX2 in patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med*. 2007; 204: 831-40.
- 58) Khong HT, Rosenberg SA. The Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10, is a novel tumor-associated antigen identified in a patient with a dramatic response to immunotherapy. *Cancer Res*. 2002; 62: 3020-3.
- 59) Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, et al. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2005; 65: 11018-25.
- 60) Wang Q, Greene MI. EGFR enhances Survivin expression through the phosphoinositide 3(PI-3) kinase signaling pathway. *Exp Mol Pathol*. 2005; 79: 100-7.

## 1. エピジェネティクスにより制御される腫瘍の免疫逃避機構

札幌医科大学第1病理学 中津川宗秀  
同 准教授 鳥越 俊彦

**key words** epigenetics, immune escape, DNA methylation, histone deacetylation, HDAC inhibitor

### 動 向

これまでさまざまながん抗原が同定され、それらを標的とした能動的免疫療法の臨床試験が盛んに行われているが、現在のところ顕著な臨床効果が認められた症例は限られている。免疫療法不応性の原因は一様ではないが、主因の一つにがんの免疫逃避があげられる。これまで、遺伝子の変異や欠失による免疫逃避機序はよく研究されてきたが、近年、エピジェネティクスとがんについて解析が進み、遺伝子変異を伴わない免疫逃避機序が徐々に明らかになりつつある。本稿では、現在までに報告されているエピジェネティックな免疫逃避のメカニズムについて、我々の研究を含めて概説する。

### A. 免疫細胞のがん細胞障害経路と免疫逃避

がんに対する免疫監視機構において主要なエフェクター細胞は、T細胞とNK細胞である。T細胞とNK細胞はいずれもがん細胞表面に発現している標的抗原を認識して活性化するが、T細胞はTCRを介してがん細胞表面のMHC class I, class II分子に提示された抗原ペプチドを認識す

るのに対し、NK細胞は、NKG2DのようなNK活性化受容体分子を介して、がん細胞表面のNK標的分子〔たとえばMHC class I related chain A, B (MICA, MICB)〕を認識する。標的細胞を障害する機序はよく似ており、T細胞、NK細胞ともにパーフォリンや細胞障害性顆粒を放出し、細胞膜に穴を開け、グランザイムのような蛋白分解酵素の活性によって細胞にアポトーシスを誘導したり、また細胞表面にFas-LやTRAILを発現し、標的細胞のDeath受容体を活性化させてアポトーシスを引き起こす (図1)。

それに対してがん細胞は、これら免疫細胞の標的となる抗原分子やアポトーシスにかかわるさまざまな遺伝子の発現を抑制したり、cFLIP, SPI-6, IAPs, BCL-2などのアポトーシス抑制分子を過剰に発現することによって、免疫監視機構から逃避している。

### B. エピジェネティクスによる遺伝子発現制御

遺伝子発現抑制をもたらすエピジェネティックな変化として代表的なものは、DNAメチル化とヒストン脱アセチル化である。遺伝子プロモ-

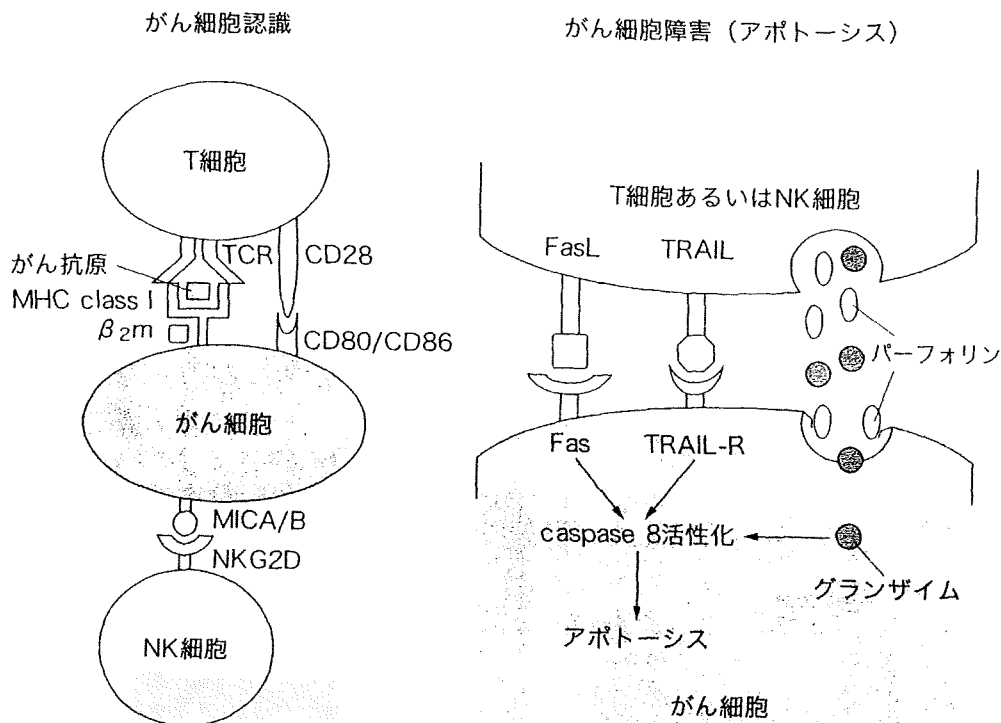


図1 がん細胞認識・障害経路

ター領域に CpG アイランドとよばれるシトシン-グアニン配列 (CpG 配列) の豊富な DNA 配列が存在している、そのシトシンが DNA メチル化酵素 DNA methyltransferase (DNMT) によってメチル化され、メチル化シトシンに MBP (methyl-CpG-binding protein) が結合し、MBP にさらにヒストン脱アセチル化酵素 histone deacetylase (HDAC) が結合することで、ヒストンの脱アセチル化が起こる。ヒストンの脱アセチル化が起こるとクロマチンは凝集し、プロモーター領域に転写因子がアクセスできなくなり遺伝子発現が抑制される。この他に、DNA メチル化に依存しないヒストン脱アセチル化も知られている。このようなエピジェネティックな遺伝子発現制御は、個体発生や細胞分化の過程で生理的に起こっていることが知られていたが、近年、がん細胞においては、さまざまな増殖抑制遺伝子やアポトーシス誘導遺伝子の発現が、過剰な DNA メチル化によって転写抑制されていることが明らかにされている。遺伝子の欠失や変異を伴わないでが

ん抑制遺伝子の発現が失われ、細胞のがん化にかかわっているのである。この発見は、がん治療法に新たな光明をもたらした。ジェネティックな変化は不可逆的な変化であるため、根本的に修復するには遺伝子治療しか方法はない。しかし、エピジェネティックな変化は可逆的な変化であるため、DNA メチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化阻害剤によって、失われたがん抑制遺伝子の発現回復が期待できるのである (図2)。このようにして、現在世界中でがんのエピジェネティクス治療薬が臨床試験の段階にある (表1)。

### C. エピジェネティクスにより制御されるがんの免疫逃避

がん細胞において、DNA メチル化あるいはヒストン脱アセチル化によって発現制御されている遺伝子は、がん細胞の生存や増殖に都合の悪いがん抑制遺伝子群ばかりではない。前述したように、がん細胞は免疫監視機構からのがれるために、標



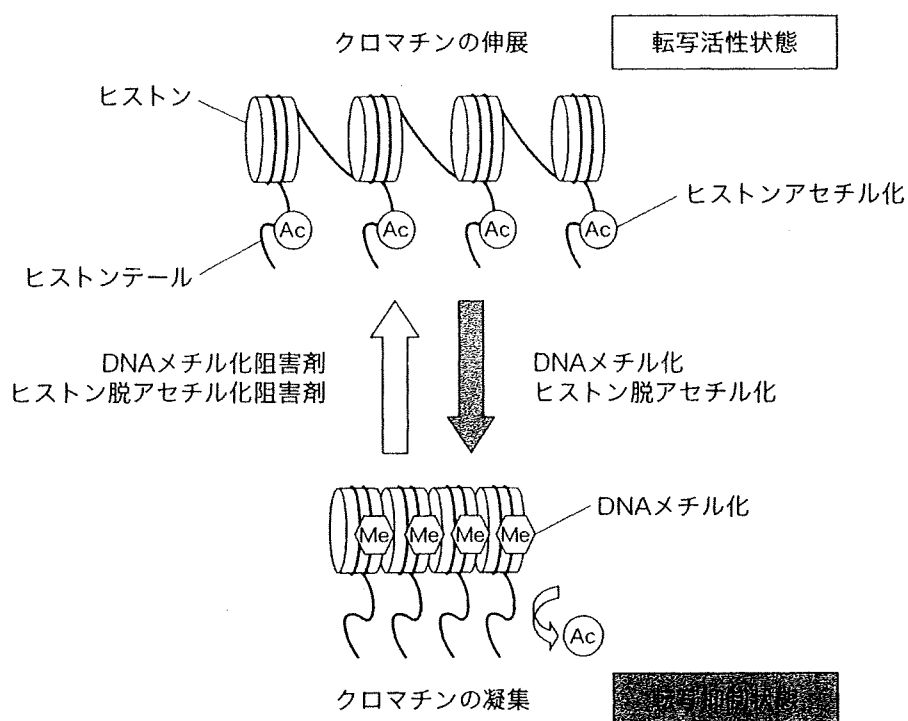


図2 エピジェネティクスによる遺伝子発現制御

表1 臨床試験中のエピジェネティクス治療薬 (文献1~6を改変)

| 阻害剤                                     | 対象疾患  |
|---|---|
| <b>DNAメチル化酵素阻害剤 (DNMT inhibitor)</b>    |   |
| 5-azacytidine                           | 血液悪性腫瘍<br>骨髄異形成症候群 (FDA承認)                          |
| 5-aza-2'-deoxycytidine                  | 血液悪性腫瘍, 子宮頸がん, 非小細胞肺がん, 腎細胞がん<br>骨髄異形成症候群 (FDA承認)   |
| <b>ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor)</b> |   |
| 短鎖脂肪酸                                   |   |
| butyrate                                | 結腸直腸がん  |
| valproic acid                           | 血液悪性腫瘍, 頭頸部がん                                       |
| ヒドロキサム酸                                 |   |
| SAHA                                    | 前立腺がん, 膀胱がん, 乳がん, 大腸がん, 悪性リンパ腫<br>皮膚T細胞リンパ腫 (FDA承認) |
| LBH-589                                 | 進行固形がん, 皮膚T細胞リンパ腫                                   |
| 環状テトラペプチド                               |   |
| FK-228 (FR901228)                       | 大腸がん, 腎細胞がん, 悪性黒色腫, 非小細胞肺がん, 白血病,<br>多発性骨髄腫         |
| ベンズアミド                                  |   |
| MS-275                                  | 腎細胞がん, 悪性黒色腫, 非小細胞肺がん, 肉腫, 悪性リンパ腫                   |

的抗原遺伝子や細胞性免疫を賦活化する遺伝子をも、エピジェネティクスによって発現制御していることが明らかになってきた。

エピジェネティクスによって制御されていることが報告されている免疫関連遺伝子と、その発現を回復させるDNAメチル化酵素阻害剤 (DNMT

inhibitor)あるいはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor) を表2に示す。

### 1. 腫瘍抗原の発現低下

メラノーマをはじめとして、さまざまながん腫において cancer-testis antigen は免疫系に認識されやすい immunodominant な抗原として知られている。MAGE family や NY-ESO-1 の発現が低

下しているがん細胞株を DNMT 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine や HDAC 阻害剤である trichostatin A で処理すると、その発現が回復する。また、DNMT 阻害剤と HDAC 阻害剤の併用に相乗効果があるとも報告されている<sup>7-9)</sup>。このことは、がん細胞はエピジェネティクスな機序によって免疫原性の高い拒絶抗原の発現を抑制し、免疫監視機構からのがれていることを示唆してい

表2 エピジェネティクスにより制御される免疫関連遺伝子

| 発現抑制遺伝子                  | がん腫                    | 発現回復薬剤   |          | 文献 |
|--------------------------|------------------------|----------|----------|----|
|                          |                        | DNMT 阻害剤 | HDAC 阻害剤 |    |
| 1. 腫瘍抗原の発現低下             |                        |          |          |    |
| MAGE family              | 前立腺がん, 乳がん, 大腸がん       | 5-AZA-DC | TSA      | 7  |
|                          | 白血病細胞                  | 5-AZA-DC |          | 7  |
|                          | 肺がん                    | 5-AZA-DC |          | 8  |
|                          | 神経膠芽腫                  | 5-AZA-DC |          | 9  |
| NY-ESO-1                 | 腎細胞がん, 大腸がん, 乳がん, 肺がん, | 5-AZA-DC |          | 8  |
|                          | 骨肉種, 平滑筋肉腫, メラノーマ      |          |          |    |
| GAGE1-6                  | 腎細胞がん                  | 5-AZA-DC |          | 8  |
| 2. 抗原提示関連分子の発現低下         |                        |          |          |    |
| MHC class I              | 神経芽細胞腫                 |          | TSA      | 10 |
|                          | 前立腺がん                  |          | TSA      | 11 |
|                          | 巨核球性白血病                |          | SB       | 12 |
|                          | メラノーマ                  | 5-AZA-DC |          | 13 |
| $\beta_2$ -microglobulin | 前立腺がん                  |          | TSA      | 11 |
| MHC class II             | 神経芽細胞腫                 |          | TSA      | 10 |
|                          | HeLa                   |          | TSA      | 14 |
|                          | 骨髄単球性白血病               |          | SB       | 12 |
|                          | B細胞リンパ腫                |          | TSA      | 15 |
| CIITA                    | 扁平上皮がん                 |          | TSA      | 16 |
| 3. 接着共刺激分子の発現低下          |                        |          |          |    |
| CD80, CD86               | 骨髄単球性白血病               |          | SB       | 12 |
| 4. NK細胞活性化分子の発現低下        |                        |          |          |    |
| MICA/MICB                | 白血病, 乳がん, 大腸がん         |          | FR901228 | 17 |
|                          | 肝細胞がん                  |          | VPA      | 18 |
| 5. アポトーシスシグナル関連分子の発現低下   |                        |          |          |    |
| Fas, TRAIL-R2 (DR5)      | 骨髄性白血病                 |          | VPA      | 19 |
| TRAIL-R1 (DR4)           | 神経膠芽腫                  | 5-AZA-DC |          | 20 |
|                          | 卵巣がん                   | 5-AZA-DC |          | 21 |
| caspase 8                | 神経芽細胞腫                 | 5-AZA-DC | TSA      | 22 |

5-AZA-DC: 5-aza-2'-deoxycytidine, VPA: valproic acid, TSA: trichostatin A, SB: sodium butyrate  
DNMT: DNA methyltransferase, HDAC: histone deacetylase

る。MAGE familyを標的としたワクチン療法の臨床試験が実施されているが、初期には腫瘍縮小効果があったものの、やがて標的抗原の発現が低下し、ワクチン不応性になる例が報告されている。このような症例ではMAGE遺伝子のメチル化やヒストン脱アセチル化が亢進していると推察され、ワクチン不応症例に対するエピジェネティック治療薬併用ワクチン療法の有効性が期待される。

## 2. 抗原提示関連分子の発現低下

T細胞抗原受容体は、主にMHCによって提示された抗原ペプチドを認識する。したがって、細胞表面へのMHC分子の発現に影響を及ぼす遺伝子の発現低下は、T細胞からの免疫逃避につながる。MHC class I分子は重鎖と軽鎖 $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta_2$ M)とのヘテロダイマーからなるため、これらいずれの遺伝子発現が低下しても、細胞表面への発現レベルは低下する。ヒトの場合、重鎖にはHLA-A, B, Cの3種類の遺伝子があるが、軽鎖は $\beta_2$ Mで共通している。したがって、 $\beta_2$ Mの発現低下は、3種類のHLAすべての発現レベルに影響を及ぼすことになる。

我々は、免疫組織学的に各種がん組織におけるHLA class I分子の発現レベルを検討した。その結果、乳がんと前立腺がんでは他のがん種と異なり、約8割でHLA class Iの発現が低下していること、そしてその原因は $\beta_2$ M遺伝子のヒストン脱アセチル化であることを見出した。乳がん細胞株や前立腺がん細胞株をHDAC阻害剤で処理すると、 $\beta_2$ Mレベルの回復とともに細胞表面へのHLA class I発現も回復した<sup>11)</sup>。我々はサバイビン2Bペプチドワクチンの臨床試験を実施しているが、乳がんを対象とした場合、他のがん種と比較して著しく臨床効果が低かった。この原因の一つに上で述べたような免疫逃避機序が関与していると推察され、今後乳がんと前立腺がんを対象と

したワクチン療法では、HDAC阻害剤を併用したプロトコルを検討する必要がある。

MHC class Iだけでなく、MHC class II遺伝子や転写因子CIITAの発現もエピジェネティックな制御を受けていることが報告されている<sup>16)</sup>。

## 3. 接着共刺激分子 (副刺激分子) の発現低下

T細胞が活性化するためにはTCRを介する抗原刺激 (第1シグナル) とともに、接着共刺激分子 (adhesion-costimulatory molecules) に由来する第2シグナルが必要であることが知られている。がん細胞は、この共刺激分子の発現を抑制し、T細胞による免疫監視からのがれている。Maedaらは、骨髄単球性白血病細胞株において共刺激分子CD80, CD86の発現が抑制されており、HDAC阻害剤の一つであるsodium butyrateによってその発現が回復されることを報告している<sup>12)</sup>。すなわち、HDAC阻害剤を用いることによって、がん細胞の免疫原性が飛躍的に増大する可能性がある。

## 4. NK細胞活性化分子の発現低下

NK細胞は、細胞表面にNKG2Dレセプターのような活性化受容体をもっており、標的細胞の細胞膜上に発現される糖蛋白をリガンドとして活性化し、細胞傷害性を発揮する。このような活性化受容体の代表的なリガンドとしてMICA/MICBが知られている。白血病、乳がん、大腸がん細胞株においてほとんど発現していなかったMICA/MICBが、HDAC阻害剤FR901228によって発現回復した<sup>17)</sup>。また同様に、肝細胞がん細胞株においてHDAC阻害剤valproic acidによる発現回復が報告されている<sup>18)</sup>。我々は、乳がん細胞株をvalproic acid存在下で培養し、それによって発現が増加する遺伝子について、DNA microarrayを用いて網羅的に解析した。その結果、MICA/MICBを含む数種類の細胞性免疫標的抗原

遺伝子が見出された。我々は、このようにHDAC阻害剤によって発現が増加ないし回復する抗原分子群をHDAC抗原とよんでいるが、このなかには免疫監視機構のなかで最も抗原性の高い分子群が含まれているのではないかと推察している。T細胞の標的抗原ばかりでなく、NK細胞の標的抗原もHDAC抗原に含まれていることは、NK細胞もがん免疫監視機構において重要な役割を担っていることを示唆しており、HDAC阻害剤はNK細胞に対する感受性も回復させる可能性がある。

### 5. アポトーシスシグナル関連分子の発現低下

T細胞もNK細胞も、標的がん細胞を認識した後、FasリガンドやTRAILによって標的がん細胞の細胞死受容体分子を活性化し、アポトーシスを誘導する。骨髄性白血病細胞において発現がほとんどみられなかったFasやTRAILレセプター2 (DR5) が、HDAC阻害剤によって発現することが報告されている<sup>20)</sup>。また卵巣がん細胞株では、DNAメチル化阻害剤によってTRAILレセプター1 (DR4) の発現が回復し、アポトーシスが誘導されている<sup>21)</sup>。神経芽細胞腫細胞株においては、細胞死受容体ばかりでなく、細胞内アポトーシスシグナル伝達分子も同様にエピジェネティックな制御を受けているらしい。アポトーシスシグナル伝達プロテアーゼcaspase 8がHDAC阻害剤やDNAメチル化阻害剤によって発現回復し、TRAIL誘導性アポトーシスに感受性となることが報告されている<sup>22)</sup>。このことは、エピジェネティック治療薬は、免疫担当細胞の標的認識フェーズばかりでなく、細胞傷害エフェクターフェーズにも効果を発揮する可能性を示唆している。

### むすび

がん細胞はエピジェネティックな変化によって生存や増殖に不都合な遺伝子群の発現を抑制し、

悪性形質を獲得しているばかりでなく、免疫監視機構に認識される不都合な遺伝子群をも抑制し、免疫から逃避している。しかし、可逆的な変化であることを利用して、DNAメチル化阻害剤やヒストン脱アセチル化阻害剤を用いた抗原性の回復が新たな免疫療法として期待される。HLA class I抗原の発現を失ったがんは、乳がん・肺がん・大腸がん・尿路がん・肉腫など、ほとんどの種類のがんで有意差をもって再発率が高い。エピジェネティック治療薬によって、がん組織で低下しているHLA class I抗原の発現を回復させることができれば、それだけでも患者予後を改善できる可能性がある。がんワクチンや細胞療法などの能動的免疫療法とうまく組み合わせることができれば、現在直面している免疫療法の限界を突破できるかもしれない。

### 文献

- 1) Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(1): 37-50.
- 2) Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Oncol.* 2005; 32(5): 443-51.
- 3) Sandor V, Bakke S, Robey RW, et al. Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(3): 718-28.
- 4) Byrd JC, Marcucci G, Parthun MR, et al. A phase I and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005; 105(3): 959-67.
- 5) Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, et al. Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(10 Pt 1): 3578-88.
- 6) Ryan QC, Headlee D, Acharya M, et al. Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma. *J Clin*

- Oncol. 2005; 23(17): 3912-22.
- 7) Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2006; 4(5): 339-49.
  - 8) Coral S, Sigalotti L, Altomonte M, et al. 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: immunotherapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(8): 2690-5.
  - 9) Liu G, Ying H, Zeng G, et al. HER-2, gp100, and MAGE-1 are expressed in human glioblastoma and recognized by cytotoxic T cells. *Cancer Res.* 2004; 64(14): 4980-6.
  - 10) Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, et al. Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol.* 2000; 165(12): 7017-24.
  - 11) Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, et al. Down-regulation of HLA class I antigens in prostate cancer tissues and up-regulation by histone deacetylase inhibition. *J Urol.* 2007; 178(2): 692-6.
  - 12) Maeda T, Towatari M, Kosugi H, et al. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 2000; 96(12): 3847-56.
  - 13) Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, et al. Expression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer.* 2001; 94(2): 243-51.
  - 14) Zika E, Greer SF, Zhu X-S, et al. Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhanceosome formation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(9): 3091-102.
  - 15) Gialitakis M, Kretsovali A, Spilianakis C, et al. Coordinated changes of histone modifications and HDAC mobilization regulate the induction of MHC class II genes by Trichostatin A. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(3): 765-72.
  - 16) Kanaseki T, Ikeda H, Takamura Y, et al. Histone deacetylation, but not hypermethylation, modifies class II transactivator and MHC class II gene expression in squamous cell carcinomas. *J Immunol.* 2003; 170(10): 4980-5.
  - 17) Skov S, Pedersen MT, Andresen L, et al. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res.* 2005; 65(23): 11136-45.
  - 18) Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM, et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res.* 2005; 65(14): 6321-9.
  - 19) Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med.* 2005; 11(1): 71-6.
  - 20) Eramo A, Pallini R, Lotti F, et al. Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction. *Cancer Res.* 2005; 65(24): 11469-77.
  - 21) Horak P, Pils D, Haller G, et al. Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res.* 2005; 3(6): 335-43.
  - 22) Fulda S, Debatin K-M. 5-Aza-2'-deoxycytidine and IFN-gamma cooperate to sensitize for TRAIL-induced apoptosis by upregulating caspase-8. *Oncogene.* 2006; 25(37): 5125-33.

## 要旨

I型インターフェロンは特異的な受容体を介して、主にJakキナーゼとStat転写因子、IRF転写因子という細胞内シグナル伝達経路を活性化させることで、さまざまな誘導遺伝子を発現誘導し、多彩な作用をひき起こす。その代表的な生物学的活性の抗ウイルス作用をもつサイトカインであるI型IFNは、腫瘍に対して直接および間接的な抑制効果を示すことが知られている。また定常状態から微量に発現するI型IFNによるシグナルが免疫系を介する腫瘍監視機構にも関与していることも示されてきた。一方、当初、ウイルス感染によるI型IFN遺伝子の産生誘導に関与する転写因子として発見されたIFN調節因子(IRFs)は現在9つのメンバーが同定されているが、このメンバーの中には、IFN産生とは無関係にがん化のプロセスに対する正および負の制御に関係していることが明らかとなってきた。このようなIFN-IRF系のがんとの関連性を考慮すると、IFNシグナル伝達に関わる分子のみならず、がんに関わるIRFファミリーメンバーをターゲットとした治療の有用性が示唆される。

## キーワード

- I型インターフェロン
- インターフェロンによる“弱いシグナル”
- IRF転写因子
- Toll様受容体 (TLR)

## 41-3・I型インターフェロンシグナル

典型的なI型インターフェロンinterferon (IFN)によるシグナル伝達経路は、2種類の受容体サブユニットであるIFNAR-1およびIFNAR-2の各々に会合しているTyk2とJak1の活性化から始まる。次にStat1, Stat2, さらにIFN調節因子interferon-regulatory factor (IRF)ファミリーメンバーであるIRF-9が加わったヘテロ三量体から構成されるISGF3 (IFN-stimulated gene factor3) 転写因子複合体が形成される(図41-4)。この主要な経路のほかに、Stat1ホモ二量体であるAAF (IFN- $\alpha$ -activated factor)も形成され(図41-4)、これらの2種類の転写因子複合体が核内移行して各種IFN誘導遺伝子interferon-stimulated gene (ISG)の調節領域に結合し、転写が開始される。この場合のISGF3とAAFのコンセンサス結合配列は、各々ISREおよびGAS (IFN- $\gamma$ -activated site)と呼ばれる。I型IFNによる生物学

的活性は抗ウイルス作用をはじめ、抗腫瘍作用や免疫調節作用と少なくともこの3つの主要な作用で代表されるが、このような多彩な生物学的活性は、下流で発現されるさまざまなISGによる作用の総和と考えられる<sup>1)</sup>。

I型IFNに属するIFN- $\alpha/\beta$ は腎がんや脳腫瘍などの悪性腫瘍の治療に臨床応用され、一部のがんにおいてはその効果も確認されている<sup>2-5)</sup>。I型IFNシグナルによる抗腫瘍作用のメカニズムについては腫瘍細胞に直接的な作用と免疫賦活を介する間接的な作用の2つの局面から考えられる。IFN- $\alpha/\beta$ の直接的な抗腫瘍効果として、これまでTRAILなどを誘導する分子の発現誘導や逆にBcl-2などの因子の発現抑制といったアポトーシス制御のほか、増殖や細胞周期の制御、細胞分化誘導、腫瘍関連抗原やMHC (major histocompatibility complex) クラスI分子の発現増強などにかかわることが示され

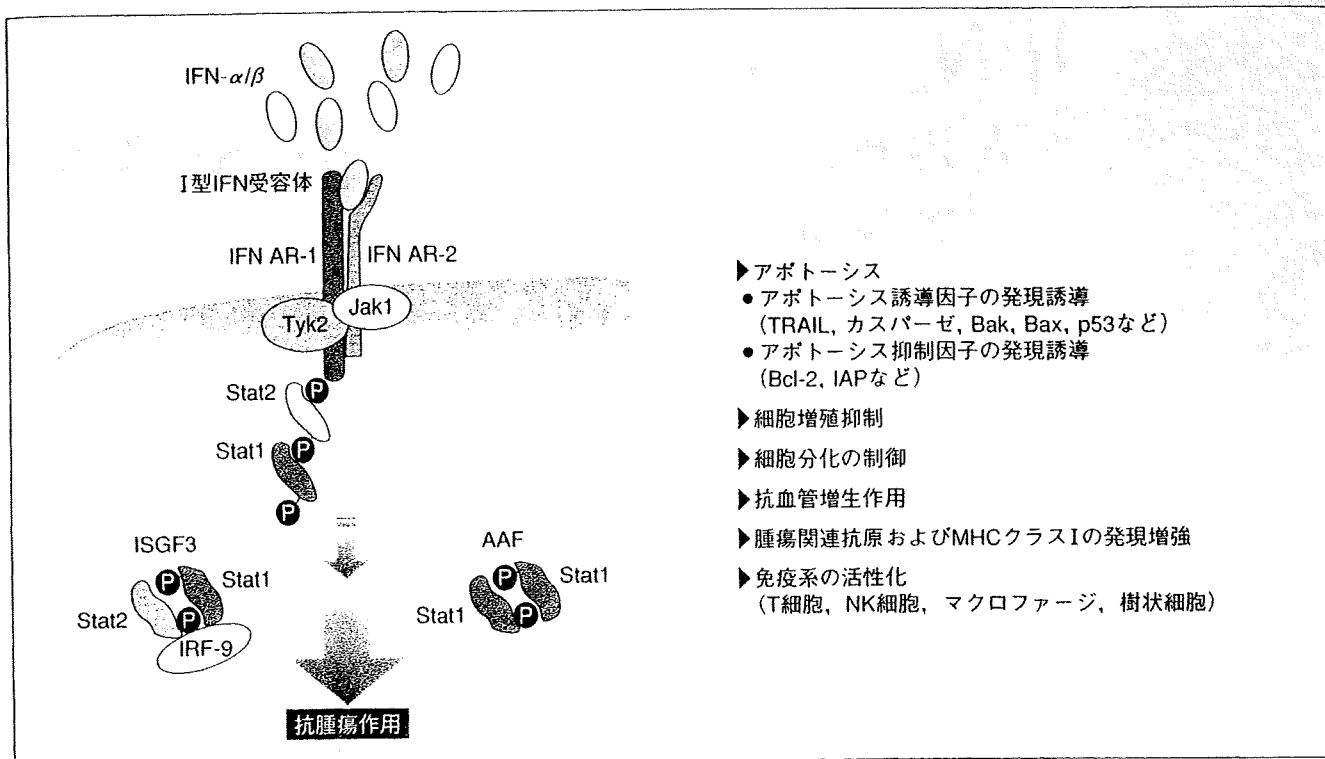


図41-4 I型IFN受容体とIFNシグナルによる抗腫瘍作用発現に関するメカニズム

## キーワード解説

- **I型インターフェロン**：インターフェロン(IFN)は抗ウイルス作用を有するサイトカインとして知られ、その受容体の違いから、I型(IFN- $\alpha/\beta$ など)、II型(IFN- $\gamma$ )、そしてIII型(IFN- $\lambda$ s)の3つに分類される。ウイルス感染時に宿主細胞においてウイルス由来の主に核酸を認識することでその下流でIFN- $\alpha/\beta$ 遺伝子発現が誘導される。IFNsはさらに抗腫瘍作用や免疫賦活作用も有しており、なかでもIFN- $\alpha/\beta$ は肝がんや腎がん、脳腫瘍などのヒト悪性腫瘍に対し、多くの場合、化学療法との併用で臨床応用されている。
- **インターフェロンによる“弱いシグナル”**：I型IFNs(IFN- $\alpha/\beta$ )はウイルス感染が存在しない状態でも微量に産生されていることが報告されていた。このような構成的に産生されている微量なIFN- $\alpha/\beta$ による“弱いシグナル”は一見、何も役割がないようにみえるが、重要なシグナル増幅作用の役目があることが明らかになってきた。IFN- $\alpha/\beta$ による“弱いシグナル”がIFN- $\gamma$ およびIL-6によるシグナル伝達系や、ウイルス感染によるI型IFN産生に対して増強作用があることが示されている。すなわち、このIFN- $\alpha/\beta$ による“弱いシグナル”は、迅速に効率良く、強力な細胞応答を発現するための重要な調節機構であると考えられる。このような仕組みは、自動車を勢いよく発進させるためには“エンジンをふかしているrevving up”の方が効率が良いという仕組みと類似し、細胞のエンジンを常にふかしておくことは生体防御の細胞応答において重要な役割を担っていると考え、このようなシステムを“revving-up system”と呼んでいる。このような構成的なIFN- $\alpha/\beta$ シグナルに、細胞のがん化を防ぐための役割があることも示されている。
- **IRF転写因子**：ウイルス感染によるI型IFN遺伝子の転写制御機構の研究過程においてIFN- $\beta$ 遺伝子の発現調節領域に結合する転写因子IRF-1がT.Taniguchiのグループによって同定されたのが最初である。現在9つのファミリーメンバーが知られており、各々異なった役割を担っていることがわかってきた。I型IFNsの発現誘導に関与するのは主にIRF-3やIRF-7であり、IFNシグナル伝達に関与するのはIRF-2とIRF-9である。IRF-1やIRF-5はストレス応答によるアポトーシスや細胞周期の制御に関わっている。IRF-6は腫瘍抑制因子であるmaspin(mammary serine protease inhibitor)と会合し、乳がん細胞の浸潤と関連することが報告されている。
- **Toll様受容体 Toll-like receptor (TLR)**：ショウジョウバエの体軸形成に関わるToll分子の変異体が発見され、そのヒトホモログがToll様受容体(TLRs)である。現在少なくとも13近くのメンバーから構成されるファミリーを形成している。宿主細胞とは構造的に異なる微生物由来の核酸や脂質、タンパク質などの分子パターンの構造を認識する受容体である。抗原提示細胞などでは、侵入した病原体を感知し、受容体下流でIFNをはじめとするサイトカインやケモカイン、共刺激分子などの発現を誘導することで自然免疫系のみならず適応免疫系の活性化をひき起こす。腫瘍免疫においても関連性が示唆されている。

てきた<sup>6)</sup>(図41-4)。これに加え、IFN- $\alpha/\beta$ によってがん抑制因子であるp53の遺伝子発現誘導が行われることが報告されている<sup>7)</sup>。このp53の誘導はIFN- $\alpha/\beta$ シグナルの下流で、IRF-9を含むISGF3を介して行われる。IFN- $\alpha/\beta$ 自体にp53を活性化させる作用は認められないが、IFN- $\alpha/\beta$ 処理による細胞内のp53のタンパク質レベルの増加によって、DNA損傷時のp53を介する応答性が増強されることが示された。これはIFN- $\alpha/\beta$ 処理によって抗がん剤投与やX線照射の結果誘導されるアポトーシスの程度が増強されることが期待され、効果的なIFN- $\alpha/\beta$ 併用療法への1つのヒントを提示しているものと考えられる。おそらく生体内におけるIFNの効果は多様性に富んでおり、このような直接作用に加え、特にNK細胞をはじめとする免疫賦活を介する間接的な抗腫瘍作用も併せて発現されるものと考えられる。

一方で、I型IFNシグナルとがん化抑制との関連性についても興味深い知見が得られている。定常状態において、細胞ががん化を起こした場合に免疫システムにより、それを排除する機構が存在していることが知られている。このようなcancer immunoeditingという局面において、I型IFNシグナルが関与し、発がん過程において抑制的に働

いていることが報告されている<sup>8)</sup>。実際、ウイルス感染がない状況においても、発現レベルはかなり低いながらも構成的にI型インターフェロンが産生されていることが示されている<sup>9)</sup>。この微量なIFNによる“弱いシグナル”は、IFN- $\gamma$ やIL-6によるサイトカインシグナル応答やウイルス感染時のIFN- $\alpha/\beta$ 産生についてより強力な細胞応答を発現するための調節シグナルとしてその重要性が示されている<sup>7,9)</sup>。この場合の微量なIFN- $\alpha/\beta$ 産生のメカニズムは、ウイルス感染時に引き起こされる大量のIFN- $\alpha/\beta$ 産生機構とは異なっており、IRF-3やIRF-9には依存しないようであるが、詳細な産生メカニズムはまだ明らかにされていない。

#### 41-4・IRFファミリー転写因子

ウイルス感染によるIFN- $\alpha/\beta$ 遺伝子産生誘導機構の解明はIRFの発見により急速に進展した。IFN- $\beta$ 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子として一番はじめに発見されたのがIRF-1であり、マウスやヒトにおいては現在までに9つのメンバーが同定されている<sup>10)</sup>。N末端側にファミリーメンバー間で共通して保存された領域としてIRFドメインと呼ばれるDNA結合ドメインを有する(図41-5)。IRFは多くの場合ホモ二量体やヘテロ二量体




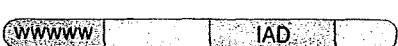

| がんに関連するIRFファミリーメンバー   | がんに対する作用    | 正常組織発現分布 | がんとの関連性                                    |
|---|-------------|----------|--|
| DNA結合領域<br>IRF-1 (325 a.a.)  | suppressive | 広く多臓器に分布 | 消化器がんや乳がん、白血病などで遺伝子異常や発現低下を認める             |
| IRF-2 (349 a.a.)             | oncogenic   | 広く多臓器に分布 | 乳がんなどで発現増強を認める                             |
| IRF-4 (450 a.a.)             | oncogenic   | 血液系細胞    | 多発性骨髄腫の細胞で染色体転座t(6;14)(p25;q32)による過剰発現を認める |
| IRF-5 (504 a.a.)             | suppressive | 広く多臓器に分布 | ヒト血液系腫瘍や消化器がんなどで発現消失を認める                   |
| IRF-8 (424 a.a.)             | suppressive | 血液系細胞    | 骨髄性白血病で発現低下を認める                            |

図41-5 がんに関連性の深いIRFファミリーメンバー

N末端にはメンバー間で保存された5つのトリプトファン(W)反復配列が特徴のDNA結合領域が存在する。また、中央部分には、メンバー間での会合領域としてIAD(IRF-association domain)ドメインが存在する。括弧内はヒトIRF転写因子でのアミノ酸のサイズを示してある。通常での細胞内局在はIRF-5が細胞質に存在する以外は上記その他のメンバーは、核内に存在している。がん化のプロセスに対して抑制的な作用を示す場合を“suppressive”、ポジティブな作用を示す場合を“oncogenic”と分類した。



を形成することが知られており、その会合に関与する領域がIAD (IRF-association domain) と呼ばれる。これらIRFはIRF-E (IRF-responsive element) あるいはISRE (IFN-stimulated response element) と呼ばれるコンセンサスDNA配列に結合する。その後の遺伝子欠損マウスを用いた解析により、実際にウイルス感染による*IFN- $\alpha$ / $\beta$* 遺伝子の発現誘導にかかわる主要な必須因子は現在のところIRF-3とIRF-7であると考えられている<sup>11)</sup>。さらに近年、Toll様受容体Toll-like receptor (TLR)などに代表される病原体認識受容体の下流でI型IFNの遺伝子のみならず、炎症性サイトカインやケモカインの発現誘導に関与しているIRFファミリーメンバーが存在していることも明らかとなっている。一方で、IRFファミリーメンバーのなかでは、IFNとは無関係にがん化プロセスと関連性が示唆されているものが多く報告されている。さらに放射線や紫外線照射、あるいは薬剤投与によるDNA損傷時の細胞周期停止や細胞死の誘導に関与することも明らかになってきた<sup>12)</sup>。最もよく研究されているのがIRF-1の腫瘍抑制作用である。マウス線維芽細胞では、IRF-1はX線照射やエトポシドなどの薬剤によるDNA損傷時に、p53と同様にATM (ataxia telangiectasia mutated) を介して発現誘導され、p53と協調してp21<sup>WAF1/Cip1</sup>を発現することで、細胞周期の停止に関与する。しかしながら、IRF-1のがん化抑制への作用はp53とは必ずしも同等ではなく、IRF-1とp53の二重欠損マウスではp53欠損マウスとは異なった種類のがんを発生し、この二重欠損マウス由来の細胞ではシスプラチンなどのDNA損傷による変異が高率にみられるようになる。IRF-1単独欠損ではがんは発生しないことから tumor susceptibility geneとして認識されている。実際に、IRF-1に関しては、消化器がんや乳がん、白血病など、さまざまながんで欠失などの遺伝子異常や発現異常が認められたり、また、全白血病状態の骨髓異形成症候群ではIRF-1 mRNAのスプライシング異常が報告されている。一方で、IRF-2はNIH3T3細胞に強制発現させるとトランスフォーメーションをひき起こす。これはIRF-1を発現させることで抑制されることから、IRF-2とIRF-1はが

ん化に対して相反的に作用していることが考えられている。また、IRF-2が、がん遺伝子として知られているヒストンH4などの遺伝子発現を正に制御している場合も知られている<sup>13)</sup>。ヒト乳がん組織におけるIRF-2発現低下が報告されている<sup>14)</sup>。

多発性骨髄腫のある患者由来の細胞では特徴的な染色体転座t(6;14)(p25;q32)が見つかり、この6p25のMUM1 (multiple myeloma 1) 座位がIRF-4であることが判明し、この結果IRF-4が過剰発現しているようだ<sup>15)</sup>。一方で、IRF-4をラットの線維芽細胞に強制発現させると細胞はトランスフォーメーションを起こすことが知られており、IRF-4の発現と骨髄腫の病因との関連性について報告されている。

IRF-5はその遺伝子の2番目のエクソン内にp53結合配列を認め、X線や紫外線照射、アドリアマイシン (ADR) 処理によりp53依存的に発現誘導され、p53標的遺伝子の1つと考えられている<sup>16)</sup>。また、IFN- $\alpha$ / $\beta$ によっても発現誘導されることも知られている<sup>17)</sup>。さらに、IRF-5を強制発現させたヒトB細胞リンパ腫や大腸がん細胞株においてはp53非依存性にG2/M期停止やアポトーシスを誘導するが、この場合IRF-5下流では、BakやBax、カスパーゼ-8、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>などアポトーシスや細胞周期に関する調節因子の発現が増強していることも報告されている。一方、IRF-5欠損マウスの解析では、DNA損傷による細胞周期の停止には関与しないが、アポトーシス誘導に関与しており、この場合、p53経路とは異なった経路を介することが示されている<sup>18)</sup>。実際、ヒト血液系腫瘍ではIRF-5遺伝子が欠失し、IRF-5の発現が消失しているものも報告されている。実際、ヒト血液系腫瘍や消化器がんではIRF-5の発現が消失しているものも報告されている<sup>17,19)</sup>。

血球系に特異的に発現しているIRF-8の遺伝子欠損マウスでは、ヒトの慢性骨髓性白血病 chronic myelogenous leukemia (CML) に類似した病態を示すようになる。実際に骨髓性白血病の約7割の患者由来の細胞においてIRF-8 mRNAの発現レベルの低下が認められており、一方で、CMLの慢性期の治療として用いられているIFN $\alpha$ の投与によって

IRF-8が発現誘導されることも報告されている<sup>20)</sup>。

このようにがん化の抑制機構の1つとしてIFNシグナルの重要性が示唆され、また、IRFファミリー転写因子はIFN産生のみならず、IFN系とは異なった経路でがん化のプロセスにも関与するなど、広

く生体防御系において重要な役割を担っていると考えられる。今後、IFN-IRFシステムの研究を推進することはがんに対するIFNの新しい治療ストラテジー構築への展開が期待されると同時に、IRF転写因子が治療の標的分子となることが想定される。

#### //// 文 献 ////

- 1) Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67: 227-264, 1998.
- 2) Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM: Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 119-134, 2002.
- 3) Gutterman JU: Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 1198-1205, 1994.
- 4) Kirkwood J: Cancer immunotherapy: the interferon-alpha experience. *Semin Oncol*, 29: 18-26, 2002.
- 5) Sakon M, Nagano H, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Yamada A, Kawata S, Imai Y, Iijima S, Monden M: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer*, 94: 435-442, 2002.
- 6) Clemens MJ: Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*, 23: 277-292, 2003.
- 7) Takaoka A, Taniguchi T: New aspects of IFN-alpha/beta signalling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci*, 94: 405-411, 2003.
- 8) Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD: A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol*, 6: 722-729, 2005.
- 9) Taniguchi T, Takaoka A: A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 378-386, 2001.
- 10) Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N: IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol*, 19: 623-655, 2001.
- 11) Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, Nakaya T, Katsuki M, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T: Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity*, 13: 539-548, 2000.
- 12) Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T: Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci*, 99: 467-478, 2008.
- 13) Vaughan PS, Aziz F, van Wijnen AJ, Wu S, Harada H, Taniguchi T, Soprano KJ, Stein JL, Stein GS: Activation of a cell-cycle-regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2. *Nature*, 377: 362-365, 1995.
- 14) Doherty GM, Boucher L, Sorenson K, Lowney J: Interferon regulatory factor expression in human breast cancer. *Ann Surg*, 233: 623-629, 2001.
- 15) Iida S, Rao PH, Butler M, Corradini P, Boccadoro M, Klein B, Chaganti RS, Dalla-Favera R: Deregulation of MUM1/IRF4 by chromosomal translocation in multiple myeloma. *Nat Genet*, 17: 226-230, 1997.
- 16) Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H: Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene*, 21: 2914-2918, 2002.
- 17) Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM: Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res*, 63: 6424-6431, 2003.
- 18) Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T: Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 3402-3407, 2007.
- 19) Hu G, Mancl ME, Barnes BJ: Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Res*, 65: 7403-7412, 2005.
- 20) Ozato K, Taylor P, Kubota T: The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action. *J Biol Chem*, 282: 20065-20069, 2007.

## がん治療の分子標的となるデス受容体のシグナル伝達分子

藤倉大輔 岩井 淳 佐藤昇志 宮崎忠昭

## 要 旨

最近、化学療法剤、内分泌療法剤、サイトカインに加えて、トラスツズマブ(ハーセプチン<sup>®</sup>)やゲフィチニブ(イレッサ<sup>®</sup>)などの分子標的薬剤ががんの治療効果を示している。これらはHER2の抗体およびEGFRのチロシンキナーゼ阻害剤であり、細胞増殖シグナルを伝達するシグナル分子の機能を抑制する。そこで、本章では、新たながん治療の分子標的であるデス受容体を介したアポトーシスシグナルにおいて重要な分子に焦点を当て、これらの機能と役割などについて紹介する。

## キーワード

- デス受容体ファミリー
- アポトーシス
- DAP3 (Death-associated protein-3)
- LKB
- アノイキス

## 41-1・デス受容体ファミリー

アポトーシスを誘導するサイトカインは、腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor (TNF) ファミリーに属するタンパク質であり、TNF $\alpha$ 、Fasリガンド (FasL)、TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) およびTL1A (TNF like ligand 1A) が同定されている(図41-1)。これらのリガンドが結合しアポトーシスシグナルを細胞内に伝達するデス受容体 death receptor (DR) ファミリー分子にはI型TNF受容体、Fas、DR3、I型およびII型TRAIL受容体 (DR4、DR5) に加えてDR6が含まれる。ただし、DR6に関してはそのリガンドは同定されていない。これらDR分子は、細胞外領域にそれぞれの特異的リガンドとの結合およびその認識に重要なシステインリッチ領域を有し、細胞内領域にはデスドメイン death domain (DD) と呼ばれる共通構造をもつI型膜貫通タンパク質である(図41-1)。DR分子のシステインリッチ領域はTNF受容体スーパーファミリーに特徴的な構造であるため、DR分子はこのファミリーのうち特にアポトーシスを誘導するサブファミリーとして位置づけられる。

これらDR分子は定常状態では細胞膜上に単量体として存在しているが、液性因子としてあるいは隣接する細胞の細胞膜上に三量体として存在するデスリガンド death ligand との結合によりDR分子の三量体が形成され、以降の細胞内シグナル伝達経路の活性化が誘導される。これまでにDR分子はさまざまな細胞内シグナル伝達経路を活性化することが報告されており、そのなかでも特にカスパーゼ caspase の活性化経路がそのアポトーシス誘導に必須であると理解されている。現在、TRAILの組換えタンパク質やDR4、DR5に対する抗体について原発性慢性リンパ球性白血病や肺がんなどの患者に対する臨床試験が行われているが、今後、カスパーゼ活性化に至るシグナル分子も抗がん剤の標的分子となるものと考えられる。一方、DR分子は転写因子であるNF- $\kappa$ B経路やMAPKファミリーの一因であるJNKの活性化を誘導し、サイトカインなどさまざまな遺伝子発現を誘導する免疫システムの制御因子としての役割を担うことも明らかにされている。また、後に詳述するがこれらのシグナル伝達経路もまたアポトーシスの誘導制

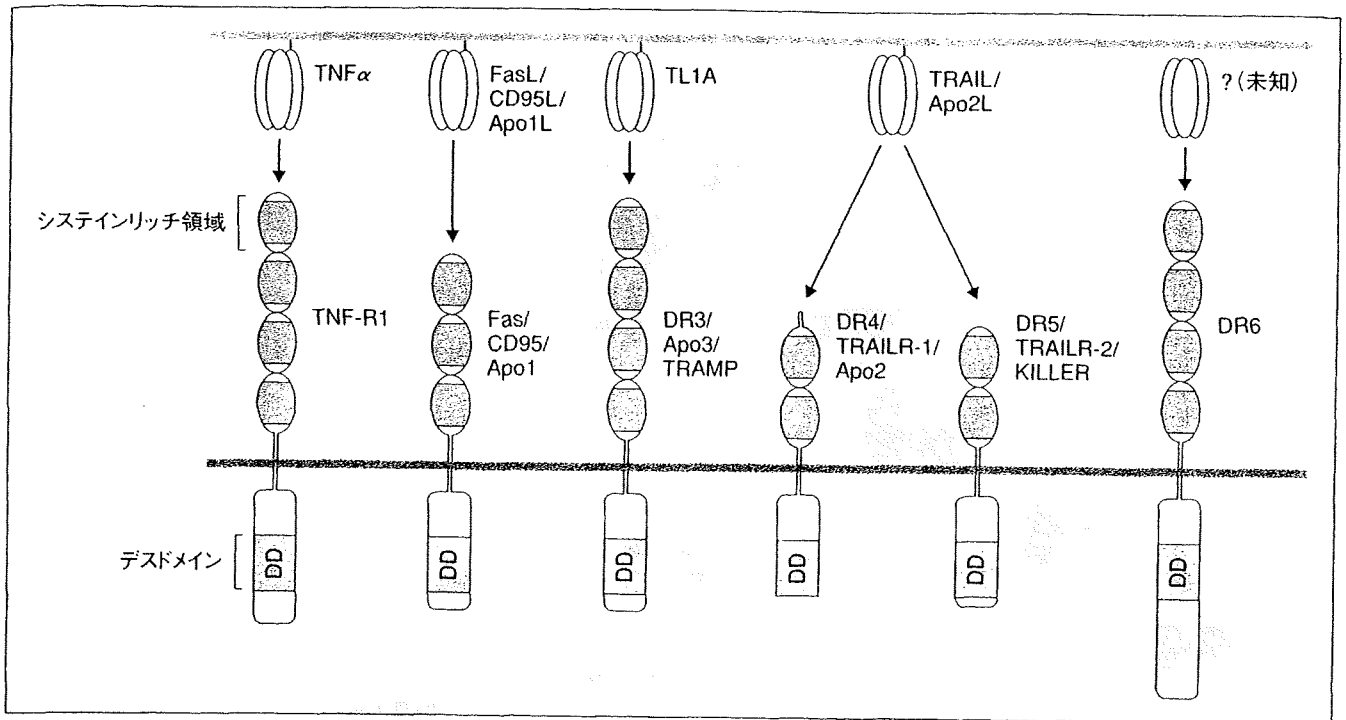


図41-1 デス受容体ファミリー分子とそのリガンド

御に参与することが示唆されており，DRを介したアポトーシス誘導経路は多段階的に厳密に制御されていることが明らかにされている。

## 41-2・デス受容体を介したアポトーシス誘導制御メカニズム

### 1. アポトーシス促進経路

S. Yoneharaら<sup>1)</sup>により，最初のDRであるFasの存在が明らかにされ，その後，そのアポトーシス誘導メカニズムの詳細について多くの研究者により精力的に研究されてきている。これまでに，既知の

分子に会合するタンパク質を同定する方法として急速に普及した酵母ツーハイブリッド法による解析の結果，Fasの細胞内領域に結合するタンパク質としてFADD (Fas associated protein with death domain) が同定された。FADDはFasと同様，そのカルボキシ末端領域に存在するDDを介して，FasのDDに結合する。一方，同様の方法を用いてFADDに結合するタンパク質としてFLICE (FADD-like ICE) が同定された。FLICEはアミノ末端領域に，FADDのアミノ末端構造と相同性の高い領域DED (death effector domain) をもち，DEDを介してFADD

### キーワード解説

- **デス受容体ファミリー**：アポトーシスを誘導するサイトカイン受容体群。Fas，I型TNF受容体，DR3，I型TRAIL受容体，II型TRAIL受容体およびDR6が含まれる。
- **アポトーシス**：生体の恒常性を維持するために必要な遺伝子レベルでプログラムされた細胞死。アポトーシス誘導の異常は，がん，自己免疫疾患などさまざまな疾患の発症や重症化に参与することが示されている。
- **DAP3** (Death-associated protein-3)：TNF $\alpha$ ，Fas，TRAILのアポトーシス誘導に重要な分子であり，ミトコンドリアの恒常性の維持にも参与する。
- **LKB**：小腸を中心とした消化管に多発性のポリープが生じる遺伝性疾患ポイツ・イエーガー症候群 (PJS) の原因遺伝子として知られるがん抑制遺伝子。
- **アノイクシス anoikis**：細胞間接着喪失により誘導されるアポトーシスであり，アノイクシスの制御はがん細胞の転移，増悪の抑制に重要である。